

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭60—1133

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 35/74

識別記号

庁内整理番号  
7138—4C

⑭ 公開 昭和60年(1985)1月7日

発明の数 2  
審査請求 有

(全 5 頁)

⑮ 微生物由来の精製されたピリジン可溶性抽出物を含有する医薬組成物

ハミルトン・リンカーン・レイ  
ン801

⑯ 特 願 昭58—116249

⑰ 出 願 昭58(1983)6月29日

優先権主張 ⑱ 1982年6月30日 ⑲ 米国(US)  
⑳ 393822

㉑ 発 明 者 ジョン・エル・キヤントレル  
アメリカ合衆国モンタナ59840

㉒ 出 願 人 リビ・イムノチエム・リサーチ、インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国モンタナ59840  
ハミルトン・ビー・オー・ボックス1409  
ールド・コルパリス・ロード・エヌ・イー581

㉓ 代 理 人 弁理士 青木朗 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

微生物由来の精製されたピリジン可溶性抽出物を含有する医薬組成物

2. 特許請求の範囲

1. 約7〜約20重量%の蛋白質、約10〜約16重量%の糖、及び約35〜約55重量%の脂肪酸を含んで成る微生物由来のピリジン可溶性抽出物、細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートのそれぞれの医薬として有効な量を、医薬として許容される担体と共に含んで成る医薬組成物。

2. 微生物が、M. ボvis (M. bovis) BCG、M. フレイ (M. phlei)、M. スメグマチス (M. smegmatis)、M. カンザンシ (M. Kansaii)、ノカルディア・ルブラ (Noocardia rubra)、コリネバクテリウム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae)、又はコリネバクテリウム・パルブム (Corynebacterium parvum)であり、そして好ましくはコリネバクテリウム・パルブム (Corynebacterium parvum)である特許請求の

範囲第1項記載の組成物。

3. 抽出物がそれぞれ約12重量%の蛋白質及び糖、並びに約45重量%の脂肪酸を含有し、そしてピリジン可溶性抽出物及び細胞壁骨格の量がそれぞれ約40%以下であり、トレハロースジミコレートの量が約6%以下であり、そして組成物が凍結乾燥の形又は油剤の形である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組成物。

4. 油がスクアレン、鯊魚油スクアラン、7-n-ヘキシルオクタデカン、コノコ・スーパーオイル (Conoco superoil) 又はドラケオール (Drakeol) 6VR鯊魚油であり、そして組成物中に、組成物の合計容量に対して約0.5〜3.0容量%存在する特許請求の範囲第3項記載の組成物。

5. 洗剤を組成物の合計容量に対して約0.02〜0.25容量%含有し、ピリジン可溶性抽出物が約200〜5000マイクログラムであり、細胞壁骨格の量が約50〜2000マイクログラムであり、そしてトレハロースジミコレートの量が約50〜1000マイクログラムである特許請求の

範囲第3項記載の組成物。

6. 約7～約20重量%の蛋白質、約10～約100重量%の糖及び約35～約55重量%の脂肪を含んで成る微生物由来のポリゾン可溶性抽出物、細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートのそれぞれの医薬として有効な量を医薬として許容される担体と共に含んでなる医薬組成物を腫瘍動物の腫瘍に直接注射することを特徴とする腫瘍動物の腫瘍の治療方法。

7. 約375～2500マイクログラム/㎖のポリゾン可溶性抽出物、並びにそれぞれ約125～375マイクログラム/㎖の細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートを含有する組成物を腫瘍に注射することを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. 約2週間の間隔で6回以下、組成物を腫瘍に直接注射する特許請求の範囲第6項又は第7項記載の方法。

9. 約200～5000マイクログラム、好ましくは約800～1200マイクログラムのポリ

ゾン可溶性抽出物、約50～2000マイクログラム、好ましくは約475～525マイクログラムの細胞壁骨格、約50～1000マイクログラム、好ましくは約475～525マイクログラムのトレハロースジミコレートを含有する組成物を、約1週間の間隔で15回以下直接腫瘍に注射することを特徴とする特許請求の範囲第8項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (発明の背景)

この発明は、微生物由来のポリゾン可溶性抽出物(ポリゾン可溶性抽出物)に関し、この抽出物は細胞壁骨格と組合わせた場合に抗腫瘍性を有する医薬組成物を供する。

コリネバクテリウム・パルブム (Corynebacterium parvum) のとき細菌が、腫瘍増殖の阻害に寄与する成分を分離しそして特徴を調べるための実験の対象とされてきた〔例えば、コントレル (Cantrell) 等、Cancer Research 39、3554～3568頁(1979年9月)、Anti Tumor Activity and Lymphoreticular

#### Stimulation Properties of Fractions Isolated from C. parvum を参照のこと〕。

抗腫瘍活性とは別に、C. パルブム (C. parvum) が脾及び肝の重量の好ましくない増加を結果するリンパ網状系及び胚子発生の効果的な刺激剤であることが示されている。出願人は、微生物のポリゾン可溶性抽出物が、従来技術の生成物が有する不所望の毒性を伴わないで効果的な抗腫瘍性を有することを見出した。

細胞壁骨格は、本質上、取り出された細胞壁中に通常見出される蛋白質及び脂質の多くを有している細胞壁である。これはトレハロースジミコレート(P3)及び未消化の結核菌蛋白質の残存物を含有する重合ミセル型アラビノガラクトランムコペプチドである。細胞壁骨格は M. スメグマテス (M. smegmatis)、M. フレイ (M. phlei)、ノカルディア・ルブラ (Nocardia rubra)、ノカルディア・アステロイデス (Nocardia asteroides)、コリネバクテリウム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae)、コリネバクテリウム・パルブム

(Corynebacterium parvum)、M. カンザシー (M. kansasii)、M. ツベルクロシス (M. tuberculosis) H37RV株及び Ayoma B 株、及び M. ガビス (M. bovis) BCG株を含む任意の微生物から得られるが、これらに限定されない。

細胞壁骨格を製造するには、M. ガビス BCG株〔バジルス・カルメッティ-グエリン (Bacillus Calmette-Guerin) のとき細菌をまず増殖せしめ、そして集菌する。こうして得た全細胞(ホルセル)残渣を、細胞を破砕する細胞分画機〔リビ・セル・フラクションーター (Ribi Cell Fractionator) ソルバル (Sorvall)、モデル RF-1〕を通して処理し、細胞質不純物から外皮すなわち細胞壁を分離する。こうして得た細胞壁を一連の溶剤抽出及び酵素処理(例えばトリプシン及び/又はキモトリプシン処理)にかけ、精製された細胞壁骨格を得る。

トレハロースジミコレート(TDM)は、例えば M. アビウム (M. avium)、M. フレイ、M. ツベルクロシス H37RV株及び Ayoma B 株、M. ガビ

スBCG、M. スメグマテス、M. カンサシー、ノカルディア・ルブラ、M. ボビニス (M. bovis) 及びコリネバクテリウム・ジフテリアのごとき微生物から得られる。

M. アビウムのごとき細菌を増殖せしめ、集菌し、そして融殺菌する。次に細胞を幾種類かの溶剤で抽出し、そして活性な溶剤可溶性区分を抽出する。この抽出物を一連の溶剤抽出によりさらに純化し粗TDMを得る〔アズマ等、Journal of the National Cancer Institute、第52巻、95～101頁(1974年) Biologically active components from mycobacterial cell walls . i. isolation and composition of cell wall skeleton and component P<sub>3</sub> を参照のこと〕。この記載を引用により明細書に組み入れる。アズマ等の記載のごとく、粗TDMを、遠心微粒シリカゲルクロマトグラフィーによりさらに精製することにより精製されたTDMを得ることができる。

従って、この発明は、微生物のポリジン可溶性

抽出物を細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートと共に含んでなる医薬組成物を提供することを目的とする。

この発明の他の目的は、微生物のポリジン可溶性抽出物、細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートを含んで成る組成物を使用する癌腫病及びヒトの腫瘍の治療方法を提供することである。

(発明の概要)

この発明は約7～約20重量%の蛋白質、約10～約16重量%の糖及び約35～約55重量%の脂肪酸を含んで成る微生物由来のポリジン可溶性抽出物、細胞壁骨格(CWS)及びトレハロースジミコレート(TDM)と共に含んで成る医薬組成物に關する。この抽出物は、約12重量%ずつの蛋白質及び糖、並びに約45重量%の脂肪酸を含有することが好ましい。

例えばM. ボビニス (M. bovis) BCG、M. フレイ (M. phlei)、M. スメグマテス (M. smegmatis)、M. カンサシー (M. kansasii)、ノカルディア・ルブラ (Nocardia rubra)、コリネバクテリウ

ム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae) 及びコリネバクテリウム・パルブム

(Corynebacterium parvum)を含む任意の微生物を使用してポリジン可溶性抽出物を製造することができる。コリネバクテリウム・パルブムが特に好ましい。

微生物の全細胞、好ましくはペースト状のものをポリジンと混合する。こうして得た混合物を分離することによりポリジン可溶性抽出物を含有する上澄区分、及びポリジン抽出残渣を得る。場合によっては、ポリジン残渣を再度上記のようにポリジンを使用する分離操作にかけ、追加量の目的抽出物を分離する。

次に、抽出物からポリジンを除去し、そして乾燥抽出物を、蒸留水のごとき適当な液に対して透析する。全細胞又は細胞断片汚染物が存在しないことを顕微鏡で確認する。こうして得た精製された抽出物は、次に公知の方法により凍結乾燥して安定な生成物を得ることができる。

この発明の方法に従って製造したポリジン可溶

性抽出物をCWS及びTDMと組合わせて、脾及び肝の肥大の誘導を刺激することなく有効な抗腫瘍活性を有する組成物を製造する。この組成物により治療することができる癌には、動物の腫瘍、例えばウシ扁平細胞癌、ウシ線維肉腫、ウマ頰肉腫、ウマ黒色腫、ウマ扁平細胞癌、イヌ乳房癌、イヌ線癌、及びイヌ黒色腫、並びにヒトの腫瘍、例えば乳癌、肺癌、結腸癌、悪性黒色腫、扁平細胞癌及び卵巢腫瘍が含まれる。

この組成物は、油剤乳剤のごとき医薬として許容される媒体中、注射により、後に評述する条件下で、腫瘍に直接投与するのが好ましい。

前記の組成物は、例えば凍結乾燥により安定化せしめ、そして効力を喪失することなく再調製することができる。

動物の治療の場合、1回の注射におけるポリジン可溶性抽出物の量は約375～約2500マイクログラム/㎖である。CWS及びTDMの量は125～375マイクログラム/㎖である。

腫瘍に注射する生物製剤のミリリットル数は次

の表に従って、腫瘍の大きさにより決定する。

腫瘍の大きさに基く動物への投与量

腫瘍の直径 (cm)	注射する生物製剤の量 (ml)
0～1	0.5以下
1～2	0.5～2.5
2～3	2.5～5
3～5	5～10
5～8	10～15
8より大	15～20

注射当たりの最大投与量は、ポリゾン可溶性抽出物及びCWSのそれぞれについて約40mgであり、TDMのそれは8mgである。治療の過程は約2週間の間隔における6回以下の注射から成る。

油剤のとき適当な注射媒体中のこの発明の組成物はヒトの腫瘍に直接投与する。1回の注射におけるポリゾン可溶性抽出物の量は約200～5000マイクログラム、好ましくは約800～1200マイクログラムであり、CWSの量は約50～2000マイクログラムであり、そして

対して約0.02～0.25容量多、好ましくは約0.10～0.20容量多とする。トウイーン(Tween)-80、アルラセル(Arlacel)(アトラス・ケミカル社製)等の任意の一般の洗剤を使用することができる。

次に洗剤の添加によって得られた混合物をホモジナイズして、顕微鏡観察した場合に活性成分により被覆された油滴を高い比率で含む懸濁液を生じせしめる。

次に、例によりこの発明をさらに詳細に説明する。但しこれによりこの発明の範囲が限定されるものではない。

#### 例1. コリネバクテリウム・バルブムからのポリゾン可溶性抽出物の調製

コリネバクテリウム・バルブム[P. アクネス(P. acne), 4182株]を、N1Hチオグリコロート培地中で48～72時間、37℃にて増殖せしめ、そして集菌して金細胞ペーストを得た。次にこのペーストを500mlの蒸留水で洗浄した。90g(湿重量)の洗浄ペーストを200mlの純

特開昭60-1133(4)

TDMの量は約50～1000マイクログラムである。CWS及びTDMの好ましい単位投与量は約475～525マイクログラムである。上記の投与レベルはいずれも典型的な70kgの成人患者を基礎にしたものである。注射はおよそ1週間に1回、合計15回以下で行う。

上記のごとく、腫血動物及びヒトの治療のための組成物は油滴剤の形で使用することができる。使用する油の量は、組成物の合計容量に対して約0.5～約3.0容量多の範囲である。約0.75～約1.5容量多の油を使用するのが好ましい。このような油の例には、輕鉱油、スクアレン、スクアラン、7-n-ヘキシルオクタデカン、コノコスーパーオイル(Conoco superoil)及びドラケール(Drakeol) 6VR鉱油[ペンレコ(Penreco)社、ペトラー(Butler)、ペンシルバニア製]が含まれる。

次に、ホモジナイズした油含有混合物を、場合によっては混合に先立って塩溶液中に溶解した洗剤と混合する。洗剤の量は、組成物の合計容量に

ポリゾンと混合し、そして4℃にて1時間1700×gにおいて遠心分離した。ポリゾン可溶性抽出物を上層区分として取り出した。残った残渣を、前記と同じ条件で追加のポリゾンを用いて抽出した。ワットマン(Whatman) 61伊紙を用いて伊過した後のポリゾン抽出物を集め、そしてブッチ・ローターエパー(Buchi Rotavapor) [ブリンクマン・インストルメンツ(Brinkman Instruments)ウエストバリー、ニューヨーク製]中、50℃にて溶剤を蒸発除去した。乾燥ポリゾン抽出物を、蒸留水に対して十分に透析し、そして凍結乾燥した。得られた、精製されたポリゾン抽出物は約12重量多の蛋白質、約12重量多の糖及び約45重量多の脂肪酸を含有していた。抽出物を電子顕微鏡で観察し、金細胞及び細胞膜断片による汚染が存在しないことが見出された。ポリゾン可溶性抽出物の収量は9多(8.1g)であった。

#### 例2. M. ギビス BCG 株からのポリゾン可溶性抽出物の調製

特開明60-1133(5)

M. 48ピスBCG株を、サウトンス(Sautons)培地中、37℃にて3~4週間増殖せしめ、そして染菌し、洗浄全細胞ペーストを得た。50g(湿重量)の洗浄ペーストを、次に例1と同様に処理し、7g(3.5g)のピリジン可溶性抽出物を得た。この抽出物は、15重量%の蛋白質、10重量%の糖及び約52重量%の脂肪酸を含有していた。

例3. モルモットにおける系統-10腫瘍に対する試験

直径約9mmに増殖した系統-10腫瘍を有する系-2モルモット6匹の腫瘍組織に直接、例1に従って調製したピリジン可溶性抽出物300マイクログラム、並びに50マイクログラムずつの細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートを含有する無菌油滴乳剤〔ドラクオール6VR鉱油(ペンシルバニアリファイニング社、ペトラー、ペンシルバニア)0.4mlを1回注射した。

3箇月後に動物を検査したところ、6動物中5動物において完全な退化が生じていた。

対照実験として、直径約9mmに増殖した系統-10腫瘍を有する系-2モルモット6の腫瘍組織に直接、ピリジン抽出物又は細胞壁骨格及びトレハロースジミコレートを含有しない前記の油滴乳剤0.4mlを1回注射した。3箇月後、6匹の腫瘍はいずれも退化の徴候を示さなかった。

特許出願人

リビイム/チェム リサーチ, インコーポレイテッド

特許出願代理人

弁護士 青 木 明

弁護士 西 館 和 之

弁護士 福 本 積

弁護士 山 口 昭 之